NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM UM SISTEMA GUIADO IN VIVO EM DEFEITOS ÓSSEOS DE CALVÁRIAS DE COELHOS COM O EMPREGO DE HIDROXIAPATITA, BIO-OSS® E BONEFILL® ASSOCIADOS OU NÃO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E/ OU PLASMA RICO EM PLAQUETAS[1]

Alice Comin Prochnov Nunes[2], Aury Nunes de Moraes[3], Luciana Alves Prati[4], Vanessa Arnaud Rocha[5]

[1] Vinculado ao projeto "Neoformação Óssea Em Um Sistema Guiado In Vivo Em Defeitos Ósseos De Calvárias De Coelhos Com O Emprego De Hidroxiapatita, Bio-Oss® E Bonefill® Associados Ou Não Com Células-Tronco Mesenquimais E/ Ou Plasma Rico Em Plaquetas"
[2] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV/UDESC – bolsista PROBIC/UDESC
[3] Orientador e Professor do Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC – aury.moraes@udesc.br
[4] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – CAV/UDESC
[5] Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – CAV/UDESC.

A pesquisa visa avaliar o comportamento *in vivo* de diferentes biomateriais: hidroxiapatita (HA), bio-oss® e bonefill®; os quais serão utilizados isolados e com a associação de células-tronco mesenquimais (CTM) e/ou plasma rico em plaquetas (PRP) para a neoformação óssea e osteointegração no processo de cicatrização em defeitos de calvárias de coelhos, em diferentes tempos de evolução. O projeto foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), e será conduzido conforme normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Esse experimento será realizado com 18 coelhos da raça New Zeland, machos castrados, com peso médio de 3,5kg e idade média de 6 meses. Os lagomorofos serão divididos em três grupos com n igual, sendo em cada grupo empregado um dos biomateriais estudados. Os três grupos serão divididos em dois subgrupos; três animais serão eutanasiados após 90 dias e os outros três após 120 dias. Imediatamente após a eutanásia, realizar-se-á a coleta das calvárias para a avaliação da osteogênese; será feita a retirada dos fragmentos ósseos contendo os guias de crescimento que serão armazenados em frascos individuais, identificados e preenchidos com formaldeído a 10% durante 7 dias. Depois, as amostras serão encaminhadas para análise histológica em microscopia de varredura e histomorfométrica. A calvária dos animais será dividida em três quadrantes (QI, QII e QIII), cada quadrante com um guia de crescimento ósseo de náilon, o qual será preenchido com os seguintes componentes: QI apenas biomaterial; QII biomaterial e CTM; e QIII biomaterial, CTM e PRP. O procedimento cirúrgico para a colocação dos guias de crescimento consiste em preparo pré-operatório mediato e imediato, onde ocorre avaliação clínica e exame físico dos animais, exames laboratoriais como hemograma e bioquímica sérica avaliando função e lesão renal e hepática, além do jejum de 4 horas pré procedimento anestésico. Imediatamente à cirurgia é realizada tricotomia da região, antissepsia do local com clorexidine, iodo álcool, e colocação de campos estéreis. Quanto à anestesia, a medicação pré-anestésica elegida foi a associação de farmácia para obter neuroleptoanalgesia, com os seguintes fármacos e doses: morfina (5mg/kg), midazolam (2mg/kg) e cetamina (20mg/kg); todos com aplicação intramuscular. A indução será realizada com máscara facial e isoflurano, e a manutenção com máscara laríngea e isoflurano a 1CAM, diluído em oxigênio a 100% com fluxo variando entre 200 e 300ml/kg/min. Como bloqueio local terá o uso de lidocaína 2% na linha de incisão.

Apoio: CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; fapesc Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina; GOVERNO DE SANTA CATARINA

As atividades desenvolvidas até então consistem em um teste *in vitro* e um *in vivo*. O primeiro fora realizado para averiguar a viabilidade das células-tronco mesenquimais de coelhos em contato com o biomaterial bonefill®, foi realizado no laboratório Bio Cell (Brasília, DF). Iniciou-se com o preparo das CTMs: um tubo com um milhão delas foi descongelado em banho-Maria a 36ºC, nele foi inserido 3ml de meio de transporte e centrifugado por 3 minutos a 1300rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 1ml de meio adicionado; esse procedimento se repetiu três vezes. Após essas lavagens as células foram translocadas para um eppendorf com 250µl de meio de transporte e 70mg do biomaterial. As leituras da viabilidade dessas células após o contato com o biomaterial foram feitas após 30 minutos, 8 horas e 24 horas. A leitura foi realizada com 0,2ml de azul de trippan e 50µl da amostra, com 10µl dessa mistura foram feitas as lâminas para leitura. A cada leitura, foram contadas 200 células e a porcentagem de células viáveis e mortas. A avaliação foi feita com duas variáveis e um grupo controle: a **variável 1** era constituída por biomaterial em contato com CTMs diluídas em meio de transporte e a **variável 2** consistia em biomaterial previamente lavado com tampão fosfato salino (PBS) em contato com CTMs diluídas em meio de transporte. Os resultados demonstram que em 30 minutos houve diferença considerável entre os grupos; a porcentagem de células mortas dos grupos controle, biomaterial, e biomaterial lavado com PBS foram respectivamente 5,50%, 40% e 24,50%. No tempo de 8h também houve diferença; a porcentagem de células mortas dos grupos controle, biomaterial, e biomaterial lavado com PBS foram respectivamente 18%, 47,50% e 25,50%. E por fim, na avaliação após 24 horas não houve diferença considerável entre as variáveis, apenas entre ambos as variáveis e o controle; a porcentagem de células mortas dos grupos controle, biomaterial, e biomaterial lavado com PBS foram respectivamente 23%, 87% e 88,50%.
O piloto *in vivo* foi realizado em dois animais submetidos aos procedimentos já descritos. Os guias de crescimento colocados nas calvárias receberam tal distribuição: no coelho 1, QI hidroxiapatita, QII bonefill® e QIII bio-oss®, todos os materiais acrescidos de CTMs; no coelho 2, QI hidroxiapatita, QII bonefill® e QIII bio-oss®, todos os materiais acrescidos de PRP. No coelho 2 os dispositivos não ficaram devidamente fixados devido a porosidade do osso, então foi mantida a colocação de apenas um, contendo hidroxiapatita e PRP. Foi realizada a eutanásia dos animais após 90 dias, e coletadas as calvárias com o uso de serra oscilatória; as quais foram acondicionadas em formaldeído por 48h e lavadas com solução tampão. As análises histológicas assim como a continuidade do projeto foram interrompidas em virtude da pandemia por Sars-Cov-2.

Palavras-chave: Cicatrização óssea. Biomateriais. Crescimento ósseo guiado.